

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
 INSTITUT NATIONAL  
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
 PARIS

(11) N° de publication :  
 (à n'utiliser que pour les  
 commandes de reproduction)

2 711 990

(21) N° d'enregistrement national :

93 13480

(51) Int Cl<sup>6</sup> : C 07 D 233/64 , 403/12 , A 61 K 31/415(C 07 D 403/12  
 , 233:64 , 207:16 )(C 07 D 403/12 , 233:64 , 207:12 )

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 05.11.93.

(71) Demandeur(s) : EXSYMOL (S.A.) — MC et  
 BABIZHAYEV Marc — SU.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
 demande : 12.05.95 Bulletin 95/19.

(72) Inventeur(s) : Seguin Marie-Christine et Babizhayev  
 Marc.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
 recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
 présent fascicule.

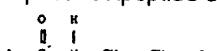
(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux  
 apparentés :

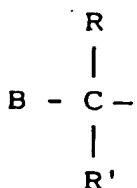
(74) Mandataire : Cabinet Bonneau.

(54) Produit pseudodipeptide possédant un groupement imidazole, et applications thérapeutiques, cosmétologiques et agroalimentaires.

(57) 1. Produit pseudodipeptide de formule générale



dans laquelle A est:  
 a) soit de la forme

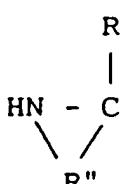


où

B représente une amine dont l'atome d'azote est directement lié à l'atome de carbone et est choisi dans le groupe des amines primaires, secondaires, ou tertiaires, des imines, des ammoniums,

R ou R' est un atome d'hydrogène, de fluor, ou un radical fluoro-alkyle, ou acyle, ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, ou un groupement fonctionnel lui-même, et

Im est un noyau imidazole ou imidazole N-substitué;  
 b) soit de la forme



où

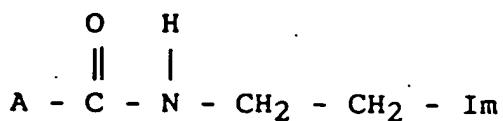
R est un atome d'hydrogène ou un radical fluoro-alkyle, acyle ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, et R'' est un radical hydrocarboné ou un radical acyle.

-R 2 711 990 - A1

La présente invention concerne les produits pseudodipeptides, et en particulier un nouveau produit pseudodipeptide possédant un groupement imidazole ou imidazole N-substitué, ainsi que les applications d'un tel produit dans les domaines thérapeutique, cosmétologie ou agro-alimentaire.

L'objet de l'invention est un nouveau produit pseudodipeptide ayant pour formule générale

10

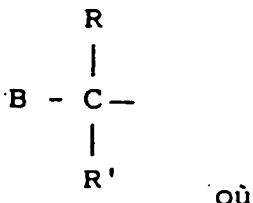


dans laquelle A est :

15

a) soit de la forme

20



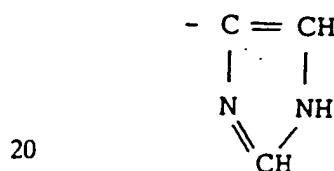
-> B représente une amine dont l'atome d'azote est directement lié à l'atome de carbone et est choisi dans le groupe consistant en

- 1) amines primaires,
- 25 2) amines secondaires de formule  $-\text{NH-X}$  dans laquelle X est un radical hydrocarboné, fluoroalkyle, acyle, acyloxy, ou une amine,
- 3) amines tertiaires cycliques du type cycloalkyle ou lactame,
- 30 4) amines tertiaires de formule  $-\text{N}-\text{Y}$  dans laquelle Y  
 $\downarrow$   
Y'
- Y' est un radical hydrocarboné, acyle, ou acyloxy,
- 35 5) imines de formule  $-\text{N}=\text{C}-\text{Y}$  dans laquelle Y est un  
 $\downarrow$   
Y'
- radical hydrocarboné et Y' est un atome d'hydrogène ou un radical hydrocarboné, et

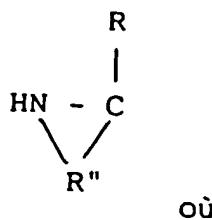
6) ammonium de formule  $\begin{array}{c} \text{Y}' \\ | \\ -\text{N}^+-\text{Y}, \quad \text{W}^- \\ | \\ \text{Y}'' \end{array}$

laquelle Y, Y', Y'' est l'atome d'hydrogène ou un radical hydrocarboné, et l'ion W est un ion halogénure, sulfato-phosphate, bicarbonate, un groupement para-toluè-sulfonate, ou un composé porteur d'un groupement carboxylate, ou un aminoacide,

- > R ou R' est un atome d'hydrogène, de fluor, ou un radical fluoro-alkyle ou acyle, ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, ou un groupement fonctionnel lui-même tel qu'un phosphate, un sulfate ou un carboxyle, et  
 -> Im est un noyau imidazole ou imidazole N-substitué tel que;



b) soit de la forme

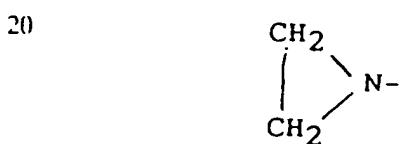


10 R est un atome d'hydrogène, de fluor, ou un radical fluoro-alkyle, acyle ou hydrocarboné, ledit radical pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, et

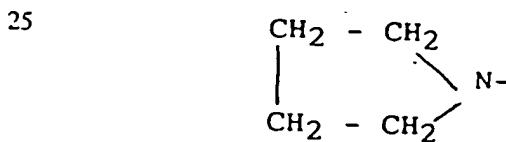
R" est un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, ou un radical acyle.

15 Dans le cas où la formule générale du produit pseudodipeptide est de la forme a) avec B étant un lactame notamment  $\delta$ - ou  $\gamma$ -lactame, ou une amine tertiaire cyclique pouvant être avantageusement

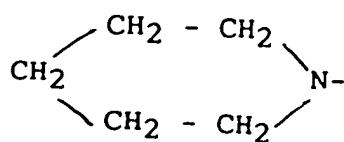
- l'aziridine



- la pyrrolidine



30 - la pipéridine



35 Dans le cas où la formule générale du produit pseudodipeptide est de la forme a) avec B étant un ammonium, ou lorsque le noyau imidazole comporte un atome d'hydrogène

supplémentaire sur l'atome d'azote, l'ion W peut être un halogénure, sulfate, phosphate, bicarbonate, un groupement para-toluène-sulfonate, un composé porteur d'un groupement carboxylate tel qu'un acétate, un trifluoroacétate, un citrate, un gluconate, un picrate, ou un aminoacide tel que l'aspartate ou le glutamate.

Dans le cas où la formule générale du produit pseudodipeptide est de la forme a) ou b) avec R, R' ou R" étant un radical hydrocarboné, ce dernier peut être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels tels que alcool, amine, carboxyle, alkoxy, thioéther, thiol, phosphate ou sulfate.

Certains éléments de cette famille de composés sont capables de former des complexes stables avec des atomes appartenant à la famille des métaux de transition, les "chélates" consistant en l'association d'un atome de métal tel que le zinc, le cuivre, le fer, le cobalt, le manganèse ou le nickel, le zinc étant pris de préférence, avec une ou plusieurs molécules de pseudodipeptides, ceci dépendant du mode de préparation et de la nature du pseudodipeptide.

Des exemples de produits pseudodipeptides particulièrement représentatifs de l'invention sont cités ci-après.

Des produits correspondant à la formule générale ayant la forme a) sont:

o L-Glutamyl-histamine

R' = H

R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH

B = NH<sub>2</sub>

o D-Glutamyl-histamine, qui est l'énantiomère du produit précédent

R' = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH

R = H

B = NH<sub>2</sub>

o N-Méthyl-2-amino-L-butyryl-histamine

R' = H

R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

5 X = CH<sub>3</sub>

o 2-aminoisobutyryl-histamine

R = R' = CH<sub>3</sub>

B = NH<sub>2</sub>

10

o L-norleucyl-Histamine

R' = H

R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

B = NH<sub>2</sub>

15

o L-2-aminoctyl-histamine

R' = H

R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

B = NH<sub>2</sub>

20

o Boc-2-amino-L-pentyl-histamine

R' = H

R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

X = tert-Butyl-O-C= O

25

o L-Phénylglycyl-histamine

R' = H

R = Phényl

B = NH<sub>2</sub>

30

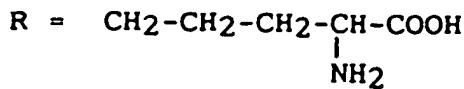
o L-Ornithyl-Histamine

R' = H

R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>

B = NH<sub>2</sub>

## o L-2,6-Diaminopimelyl-Histamine

 $R' = H$ 5       $B = \text{NH}_2$ 

## o N-Acetyl-2-Aminobutyryl-Histamine

 $R' = H$  $R = \text{CH}_2\text{-CH}_3$ 10       $X = \text{CH}_3\text{-C=O}$ 

## o N-phénacétyl-2-aminobutyryl-histamine

 $R' = H$  $R = \text{CH}_2\text{-CH}_3$ 15       $X = \text{Ph-C=O}$ 

## o L-Arginyl-histamine

 $R' = H$ 20       $R = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(NH}_2\text{)}$ 

Des produits correspondant à la formule générale ayant la forme b) sont:

## 25 o L-prolyl-histamine

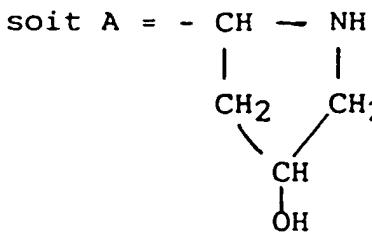
 $R = H$  $R'' = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ 

soit A = - CH — NH

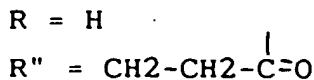


## o 4-hydroxy-L-prolyl-histamine

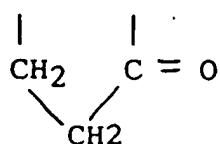
 $R = H$ 35       $R'' = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2$



## L-pyroglutamyl-histamine



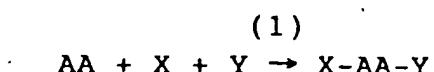
10 soit A = - CH — NH



15 Le produit pseudodipeptide selon l'invention peut être considéré comme un produit de condensation entre un alpha aminoacide et l'histamine ou l'histamine méthyl-substituée telle que la 1-méthyl-histamine ou la 3-méthyl-histamine. On peut d'ailleurs remplacer l'atome d'oxygène de la liaison amide résultante par un atome de soufre.

20 A ce titre, il peut donc être obtenu par différents procédés de synthèse aussi bien chimiques qu'enzymatiques.

Un procédé de préparation chimique adéquat pour la préparation du produit pseudodipeptide de l'invention, désigné 25 de façon symbolique par AA-Hist (AA est l'acide aminé et Hist désigne l'histamine) se présente selon le schéma suivant:



La première étape du procédé consiste à rendre l'acide aminé (AA) N-protégé par un groupement X, et O-activé par un groupement Y.

35 La N-protection est effectuée de préférence par le remplacement d'un atome d'hydrogène dans l'amine de l'acide aminé qui peut être un radical acyle ou acyloxy... Parmi les groupements protecteurs les plus intéressants on peut citer

le benzyloxycarbonyle, (Z) le 9-fluorenylméthyloxycarbonyle (Fmoc), les radicaux benzyle, phthaloyle, 2-nitrophénylsulfényle et le trifluoroacétyle.

Bien qu'il soit possible de s'en dispenser,  
 5 l'activation O est réalisée de préférence par estérification de la fonction carboxylique de l'acide aminé par un composé choisi dans le groupe consistant en: alcool de cyanométhyle, o-nitrophénol, 2,4,5-trichlorophénol, p-nitrophénol, 2,4-dinitrophénol, pentachlorophénol, pentafluorophénol, N-  
 10 hydroxyphtalimide, N-hydroxysuccinimide, 1-hydroxypipéridine et 5-chloro-8-hydroxy-quinoline.

Parmi les modes d'O-activation on peut encore citer le procédé consistant à transformer l'acide carboxylique en chlorure d'acide, un hydrazide et un anhydride "mixte" ou  
 15 symétrique.

Un mode d'activation particulier consiste à faire réagir du phosgène sur l'aminoacide AA conduisant à la formation du N-carboxy anhydride de cet aminoacide.

La deuxième étape du procédé de préparation est le  
 20 couplage avec l'histamine qui peut se faire avec ou sans agent de couplage, en faisant réagir l'acide aminé N-protégé et O-activé (ou non) avec l'histamine de préférence sous forme de dichlorhydrate. Il faut noter que l'agent de couplage n'est pas indispensable avec un acide aminé O-activé.  
 25

Le couplage sans agent de couplage s'effectue dans un solvant organique (ce peut être par exemple du chloroforme, 1,2-diméthoxy-ethane, du diméthylformamide...) en présence d'acide (par exemple acide acétique...) ou de  
 30 base (par exemple triéthylamine...) dans un solvant hydro-organique (par exemple eau-pyridine ou eau-1,2-diméthoxyethane...) en présence de base (par exemple soude ou bicarbonate de sodium...) puis d'acide (par exemple acide chlorhydrique...); dans des conditions catalytiques (par exemple imidazole, N-ethylmorpholine...)...

Si un agent de couplage est utilisé, cet agent peut-être par exemple le dicyclohexyl-carbodiimide, le N-

hydroxybenzotriazole et ses dérivés tel que le benzotriazolyloxy (trisdiméthyl-amino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP), le 1-isobutyloxycarbonyl-2-isobutyloxy-1,2-dihydroquinoline, le carbonyldiimidazole,  
 5 Woodward Reagent K, a-chlorovinyl ethyl ether, a,a-dichlorodiethyl Ether, dichloromethyl methyl ether, DCC et additifs, DCC-pentachlorophénol, DCC-pentafluorophénol, cyanamide, cetenimines et cétènes, sels d'oxazolinium, EEDQ ('1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoléine), ynamines  
 10 acylphosphoniums, triphénylphosphite et imidazole, complexes de cuivre II, SiCl<sub>4</sub>.

Lorsque cela s'avère nécessaire, le groupement X ou N-protecteur est éliminé lors d'une troisième étape:



Cette élimination se fait, selon les groupements protecteurs, par hydrogénolyse, par réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide, par hydrazinolyse, par acidolyse,  
 20 par hydrolyse ou par voie enzymatique. La solution préférée consiste à effectuer cette étape de déprotection par acidolyse par l'acide trifluoroacétique. Dans ce dernier cas, le produit pseudodipeptide est obtenu sous forme base après traitement par l'ammoniaque. En outre, lorsque cela  
 25 est recherché, le composé sous sa forme base peut être mis en présence d'un sel de métal de transition pour former un chélate.

A titre d'exemple, le procédé de préparation de la L-Glutamyl-histamine peut se faire de la façon suivante :

30      A une suspension de 2,0 g (6,59 mmol) de Boc-Glu(OtBu)-OH contenant 1,456 g (7,91 mmol) de pentafluorophénol en solution dans 8 ml d'acétate d'éthyle à 0°C est ajoutée goutte à goutte 4 ml d'une solution de 1,631 g (7,91 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide-urée dans l'acétate d'éthyle.  
 35      L'agitation à 0°C est maintenue 30 mn puis 1 heure à température ambiante.

Le mélange réactionnel est filtré pour éliminer la dicyclohexyl-urée. La dicyclohexyl-urée est lavée à l'acétate d'éthyle et le filtrat est évaporé. Le résidu huileux est séché à la pompe à palettes pendant 2 heures.

5 3,1 g de Boc-Glu(OtBu)-OPfp sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

A une suspension de 1,213 g (6,59 mmol) de chlorhydrate d'histamine dans 15 ml de diméthylformamide contenant 1,331 g (13,18 mmol) de N-Méthyl-Morpholine à 0°C est ajoutée 10 goutte à goutte une solution de Boc-Glu(OtBu)-OPfp dans 5 ml de diméthylformamide. Le mélange réactionnel est agité 2 heures à 0°C puis 1h30 à température ambiante. Le mélange réactionnel est filtré et le précipité lavé au diméthylformamide.

15 Le mélange est filtré pour éliminer le précipité de chlorhydrate de N-Méthyl-Morpholine et le précipité est lavé à l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide est évaporé sous vide de la pompe à palettes à  $t \leq 40^\circ\text{C}$ . 25 ml d'acétate d'éthyle sont ajoutés au résidu puis la fraction insoluble 20 est éliminée par filtration.

Le produit est lavé avec 20 ml d'hydrogénocarbonate de sodium 0,5M, 10 ml d'hydrogénocarbonate de sodium 0,5M, 20 ml d'eau et 20 ml d'une solution saturée en chlorure de sodium.

25 Après séchage de la phase organique sur sulfate de sodium pendant 1 heure, l'évaporation conduit à l'obtention d'une poudre blanche.

30 3,234 g (Rdt>100%) de produit sont récupérés mais la CCM montre qu'il reste du phénol et de l'histamine qui seront éliminés lors de l'étape suivante.

A 1,12 g de Boc-Glu(OtBu)-Hist solide est ajouté 25 ml d'acide trifluoroacétique. L'agitation est maintenue 1 heure à température ambiante. Le solvant est évaporé à la pompe à palettes à  $t \leq 40^\circ\text{C}$ .

35 12 ml d'éther éthylique sont ajoutés au produit qui est agité pendant 30 minutes à température ambiante. Il se forme un produit blanc à l'empâtement. L'éther est décanté, le

résidu lavé avec 10 ml d'éther éthylique puis séché à la pompe à palettes.

Le résidu est ensuite dissous dans 7 ml d'éthanol puis de l'ammoniaque à 5% est ajoutée jusqu'à pH 7,5. 25 ml 5 d'acétate d'éthyle sont alors ajoutés et le tout est placé à 0°C pour quelques heures.

Il se forme 2 phases qui sont séparées par décantation et la phase inférieure huileuse jaunâtre est évaporée. Il se forme une poudre blanche très hygroscopique. Le produit est 10 recristallisé par éthanol/acétate d'éthyle. Le produit est séparé par filtration puis lavé par le mélange éthanol/acétate d'éthyle (1/1).

510 mg de produit sont obtenus (Rdt=65%).

Les produits peptoïdes peuvent être avantageusement 15 préparés, en terme de rendement et de coût, en utilisant une méthode de synthèse tout ou en partie enzymatique.

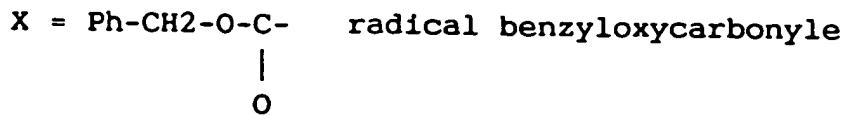
Selon ce procédé, on peut proposer les schémas de synthèse suivants :

La réaction de couplage peut être décrite par 20 l'équation suivante :



où X-AA-Y est un aminoacide N-protégé dont la préparation a 25 déjà été décrite et où le groupement protecteur X peut être un radical acyle, acyloxy,...

Dans le cas présent, le groupement X permet aussi d'accroître la solubilité de l'AA dans le milieu réactionnel. Ceci peut diriger le choix de X de façon à 30 augmenter la solubilité de l'AA dans les milieux organiques tels que :



X-AA-Y est O-activé par estérification de la fonction carboxylique par un alcool choisi dans le groupe consistant en : alcools aliphatiques, et préféablement l'éthanol, halogénoalkylalcohols tel que le 2,2,2-Trichloroéthanol, 5 alcools aromatiques tel que le phénol, ainsi que tous les alcools cités précédemment pour l'activation en synthèse chimique. Cette liste exclue toutefois tous les alcools tertiaires.

La réaction de couplage avec l'histamine base (ou ses 10 dérivés méthylés) ou un sel d'histamine (ou un de ses dérivés méthylés), par exemple le dichlorhydrate d'histamine, est réalisée dans une variété de solvants organiques, tels que les solvants hydrocarbonés aliphatiques (cyclohexane, heptane,...) ou aromatiques (toluène), les 15 alcools tertiaires (t-Butanol, tert-Amylalcool), les halogénures d'alkyle (dichlorométhane), les éthers (isopropyléther), l'acetonitrile, le diméthyformamide ou le diméthylsulfoxyde.

Ces solvants peuvent être utilisés seuls ou en association, 20 anhydres ou en présence d'une faible quantité d'eau.

La réaction peut être conduite en présence ou non d'une base, telle que la triéthylamine.

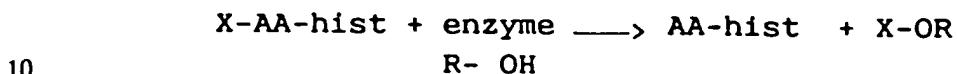
Le catalyseur enzymatique est une hydrolase (lipase, protéase) d'origine microbienne ou animale ou végétale. Il 25 peut être utilisé sous une forme pure ou non purifiée. On peut citer des qualités commerciales très peu coûteuses telles que des lipases, extraites de micro-organismes: Pseudomonas sp., Candida rugosa, Mucor, ou d'origine animale: lipase pancréatique de porc (LPP), des protéases: 30 trypsine, chymotrypsine, substilisine, papaine,...

Ce catalyseur, non soluble dans le milieu réactionnel, est dispersé dans le solvant seul ou immobilisé sur un support inert, afin de faciliter son recyclage.

- La réaction est effectuée à une température comprise entre 35 4°C et 70°C, mais préféablement entre 35°C et 45°C sous agitation.

- Le produit de couplage est recueilli par filtration ou après extraction avec un solvant approprié.
  - La déprotection et la purification peuvent être alors réalisés selon les procédés décrits pour la synthèse chimique.
- 5

Toutefois, l'étape de déprotection peut être réalisée par une réaction enzymatique selon la réaction :



où R = H ou un radical alkyle.

Le protocole est similaire à celui décrit pour l'étape de couplage, toutefois, on voit que dans le cas particulier 15 où R = H, la réaction est conduite dans l'eau.

Pour l'étape de couplage, il peut être envisagé des situations moins favorables, mais permettant de réduire les coûts de production de façon importante, en utilisant :

- un aminoacide non N-protégé (où X = H), O-activé 20 comme précédemment
- un aminoacide N-protégé mais non O-activé (où Y = H)
- ou même l'aminoacide de départ (X = Y = H)

Les conditions opératoires sont similaires à celles décrites précédemment pour le dérivé N-protégé, O-activé.

25 Les caractéristiques structurales du produit pseudodipeptide de l'invention permettent d'obtenir un principe actif insensible à la désactivation enzymatique.

La caractéristique structurale essentielle est 30 l'absence d'un groupement carboxyle sur les carbones en alpha de l'azote participant à la liaison peptidique, et pour certains des produits de l'invention, une autre caractéristique structurale est l'absence d'hydrogène sur l'atome de carbone lié à B (soit, R et R' différents de H), 35 l'atome d'hydrogène pouvant être remplacé par un atome de fluor, un radical perfluoré (R ou R' = CF<sub>3</sub>), ou un radical hydrocarboné.

D'une manière générale, la résistance à la désactivation enzymatique est favorisée par la présence de substituants stériquement encombrants sur le carbone terminal (lié à B), tels que les radicaux isopropyle,  
5 isobutyle, sec-butyle, tert-butyle ou néopentyle.

La résistance à la désactivation enzymatique est également renforcée lorsque l'amine terminale est incorporée dans une structure cyclique du type obtenu dans le b) de la formule générale ci-dessus ou du type obtenu dans le a) de  
10 la formule générale où B est une amine tertiaire cyclique (par ex. pipéridine).

D'une manière plus générale encore, la résistance aux enzymes, et en particulier aux protéases, est renforcée lorsque l'alpha aminoacide du produit pseudodipeptide  
15 présente une structure qui diffère de celle des acides aminés naturels (on parle alors d'acides aminés non protéinogéniques ou non naturels). Ceci peut être réalisé par un choix judicieux de la stéréochimie du carbone lié à B dans la formule générale. En effet la présence d'un carbone  
20 terminal asymétrique permet d'obtenir une configuration absolue différente de celle des acides aminés naturels.

#### Propriétés pharmacologiques

25 Les propriétés pharmacologiques du produit pseudodipeptide selon l'invention découlent de cette insensibilité à la désactivation enzymatique.

Ils possèdent avant tout des propriétés antioxydantes. Ils sont en effet capables de s'opposer au stress oxydatif,  
30 c'est à dire de s'opposer aux dommages provoqués par les espèces radicalaires sur les structures biologiques. Ces produits sont capables d'agir à plusieurs niveaux: ils peuvent réagir directement sur divers types de radicaux libres (R.L.), mais aussi sur des sous-produits toxiques du  
35 stress oxydatif. Il est également démontré que ces produits actifs peuvent également exercer une activité réparatrice vis à vis des altérations provoquées par les R.L. sur les structures biologiques.

La réactivité d'un membre de cette famille de composés vis à vis de telle ou telle espèce radicalaire dépend d'éléments structuraux précis, sans qu'il soit possible à l'heure actuelle d'établir de règles de structure-activité.

5 Il apparaît notamment qu'une faible différence structurale conduit à des modifications importantes du potentiel redox du pseudodipeptide, propriété physico-chimique directement liée au pouvoir antioxydant. Cette particularité rend compte de la diversité des propriétés observées pour cette famille

10 de composés. A titre d'exemple, les résultats d'expérimentations *in vitro* obtenus avec deux pseudodipeptides sont présentés:

- 1°) Mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur sur le radical libre OH<sup>•</sup>:
- 15 Protocole décrit par J.M.C. Gutteridge dans Biochemistry Journal, vol 224 (1984), p. 761-767:  
 -substrat d'oxydation: désoxyribose,  
 -système de production de radical hydroxyle OH<sup>•</sup>: EDTA/Fer,  
 $H_2O_2$ ,
- 20 -détection: acide thiobarbiturique/malondialdéhyde (MDA)  
 -antioxydant de référence: dipeptide  $\beta$ -alanyl-L-histidine (sensible aux désactivations enzymatiques)

	% inhibition
25 Témoin (absence d'antioxydant)	0
$\beta$ -alanyl-L-histidine (10mM)	38
L-prolyl-histamine (10mM)	62
L-glutamyl-histamine (10mM)	0

- 30 2°) Mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur sur l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:
- système de production d'anion superoxyde: xanthine oxydase/hypoxanthine (absence de fer)  
 -l'anion superoxyde est une substance réductrice. Elle est
- 35 en particulier capable de réduire un substrat, le cytochrome C. Sa réduction est suivie par spectrophotométrie ultraviolette à 550 nm.

Le pourcentage d'inhibition est défini comme suit :

vitesse de réduction du cytochrome c sans inhibiteur - vitesse de réduction avec inhibiteur

$$\frac{\text{vitesse de réduction du cytochrome c sans inhibiteur}}{\text{vitesse de réduction du cytochrome c sans inhibiteur}} \times 100$$

5

	L-glutamyl-histamine (mM)	% d'inhibition
	1	3,5
	5	14
10	10	24
	20	35

Dans le système enzymatique générateur d'anion supéroxyde, la L-glutamyl-histamine est capable d'inhiber fortement la réduction du cytochrome c. Cette inhibition varie en fonction de la concentration. La L-prolyl-histamine, ou l'anti-oxydant de référence, la  $\beta$ -alanyl-histamine, ne possèdent pas de pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'anion superoxyde.

20 Dans certains cas, lorsque B est une amine secondaire, le radical X s'est avéré capable de renforcer certaines propriétés antioxydantes du produit pseudodipeptide selon l'invention. C'est le cas notamment lorsque le substituant X est du tert-butoxycarbonyle ou du benzyloxycarbonyle.

25 Une autre propriété importante de ces produits est leur capacité à protéger contre le stress oxydatif aussi bien des structures biologiques lipophiles (membranes cellulaires) ou hydrophiles (biopolymères tels que protéines, ADN),

30 Grâce à la présence du noyau imidazole et d'une amine nucléophile, certains des éléments de cette famille peuvent présenter une activité anti-glycation et donc s'opposer à la condensation non-enzymatique des sucres sur les protéines et ainsi empêcher leur dégradation.

35 La présence d'un élément de structure proche de celle de l'histamine permet, pour certains éléments de cette famille, d'obtenir un comportement inhibiteur des effets biologiques de l'histamine.

A l'inverse, dans certains cas très particuliers, il est possible d'obtenir un composé possédant une partie des propriétés biologiques de l'histamine.

Enfin, ces produits présentent également des propriétés 5 cytostimulatrices et favorisent, de façon modérée, la multiplication de certains types de cellules. Cette propriété peut expliquer notamment le comportement immunostimulateur ou immunomodulateur de certains membres de cette famille de composés.

10 Selon ce mode d'action, les produits pseudodipeptides selon l'invention favoriseraient la cicatrisation en agissant sur les cellules du système immunitaire impliquées à un stade précoce dans la cicatrisation (lymphocytes, mastocytes, monocytes) et dont le rôle principal est la 15 sécrétion des facteurs de croissance.

... Ce pouvoir "immunostimulateur" est mis en évidence à l'aide d'un test *in vitro* sur splénocytes murins. Le protocole est extrait de : J. Kunert-Radek, H. Stepien, K. Lyson et M. Pawlikowski - "Effects of calcium channel 20 modulators on the proliferation of mouse spleen lymphocytes *in vitro*" - Agents and Actions, vol.29, nos 3-4 (1990), p. 254-258.

La prolifération cellulaire est suivie par la mesure du taux d'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules, 25 exprimé en nombre de désintégrations par mn, déduites du bruit de fond.

Les résultats obtenus avec un immunostimulant de référence, la concanavaline A, sont donnés à titre de comparaison.

30 L'effet immunostimulateur est exprimé par un Index de Stimulation (IS).

$$IS = \frac{\text{Nb de désintégrations par mn d'une suspension cellulaire additionnée de composé mitogène}}{\text{Nb de désintégrations par mn d'une suspension cellulaire de référence sans mitogène}}$$

35

Les valeurs correspondent à la moyenne de trois mesures.

On observe un effet immunostimulateur maximal pour une concentration de 5 µg/ml en L-glutamyl-histamine. En conclusion, on observe un effet immunostimulateur (prolifération cellulaire) modéré pour ce pseudodipeptide pour des concentrations comprises entre 5 et 10 µg/ml.

	Concentration en immunomodulateur (µg/ml)				
	2,5	5	10	25	
	IS(L-glutamyl-histamine)	7,8	42,7	42,1	5,6
10	IS (concanavaline A)	8,3	33,4	61,5	4,3

Cette activité est comparable à celle d'un mitogène de référence, la concanavaline A. Toutefois la préparation cellulaire utilisée pour ce test est hétérogène et contient en réalité plusieurs types de cellules mononucléées .

Afin de préciser le mode d'action des pseudodipeptides, une deuxième expérimentation a été réalisée sur une population homogène de monocytes humains.

20 La prolifération cellulaire a été évaluée de la même façon que précédemment:

	Concentration en immunomodulateur (µg/ml)				
	2,5	5	10	25	
25	IS(L-glutamyl-histamine)	8,23	39,8	23,5	2,5
	IS (concanavaline A)	4,82	29,6	21,1	

On met ainsi en évidence une stimulation optimum des monocytes pour la même concentration que précédemment. On observe également que ce pseudodipeptide est légèrement plus actif que la concanavaline A, d'un facteur de 1,34 en moyenne.

Ces résultats étayent l'hypothèse d'un mode d'action indirect sur les lymphocytes via l'activation des monocytes.

35 Dans la plupart des cas, la conservation in vivo de l'activité des produits pseudodipeptides de l'invention est liée à la préservation de l'intégrité de la molécule au

contact des systèmes enzymatiques hydrolytiques, et en particulier des peptidases.

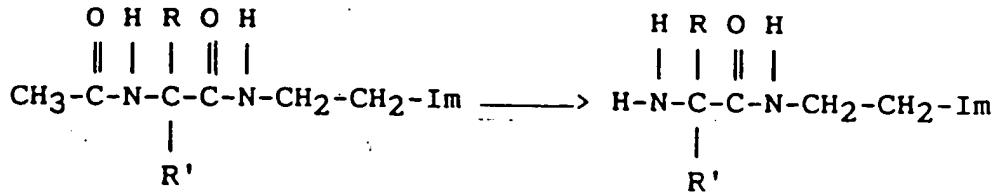
Toutefois, pour des applications particulières, une certaine sensibilité des produits pseudodipeptides de 5 l'invention aux systèmes enzymatiques a été recherchée. C'est le cas où B est une amine secondaire avec le radical X étant:



10

Le produit actif obtenu par exemple dans le premier cas, est susceptible d'être hydrolysé de façon enzymatique *in vivo* pour reformer un nouveau composé pseudodipeptide toujours actif :

15



20

On n'obtient alors qu'une protection temporaire du composé peptoïde, mais c'est aussi une façon de reformer "in-situ" la fonction amine primaire du peptoïde et ainsi de restaurer certaines propriétés liées à la présence d'une amine nucléophile, ionisable, à pH physiologique, dans la 25 molécule. On peut citer l'effet anti-glycation associé, en partie, à la capacité d'un composé aminé à se lier à l'aide d'une liaison covalente sur un sucre réducteur.

Cette stratégie peut être utile lorsqu'il est souhaitable : de modifier la polarité du peptoïde de départ 30 (afin de le rendre compatible avec une formulation particulière par exemple), d'éviter la présence d'un groupement ionisable à pH physiologique sur la molécule, ou enfin de réduire la réactivité du peptoïde vis-à-vis d'autres espèces chimiques (incompatibilité avec la présence 35 d'une espèce électrophile), présentes dans une formulation.

Cette stratégie permet aussi d'améliorer, dans certains cas, la biodisponibilité et la pharmacocinétique de cette

catégorie de produits actifs, résultant en une potentialisation de l'effet pharmacologique.

5      Applications thérapeutiques et cosmétologiques

L'ensemble des propriétés énoncées ci-dessus conduit à des applications thérapeutiques et cosmétologiques appréciables des produits pseudodipeptides selon 10 l'invention.

Les propriétés antioxydantes des pseudodipeptides selon l'invention permettent de proposer ces produits pour le traitement des pathologies associées au "stress oxydatif".

15      Parmi celles-ci, une application thérapeutique importante est le traitement de la cataracte. Les causes des différentes cataractes sont diverses. Les mécanismes impliqués dans ces pathologies, qu'elles soient du type "cataracte sénile" ou "cataracte du diabétique" sont 20 regroupés en deux catégories: les mécanismes oxydatifs (M. A. Babizhayev, A.I. Deyev, L.F. Lindberg, "Lipid peroxidation as a possible cause of cataract", Mechanisms of Ageing Dev., Vol 44 (1988); P. 69-89), et les mécanismes de réticulation du type glycation (T.J. Lyons, G. Silvestri, 25 J.A. Dunn, D.G. Dyer, J.W. Baynes "Role of glycation of lens crystallins in diabetic and non-diabetic senile cataracts", Diabetes Vol. 40, N° 8, (1991), P. 1010-1015).

30      Comme on l'a vu précédemment, les propriétés antioxydantes des pseudodipeptides s'exerçant en particulier par leur activité anti-radicaux libres et type "péroxydase" et également par leur activité anti-glycation, font des produits pseudodipeptides selon l'invention des produits efficaces pour soigner la cataracte. La capacité de ces composés à exercer une activité réparatrice vis à vis des 35 altérations provoquées par les R.L. sur les structures biologiques est particulièrement importante dans le traitement de la cataracte car elle se traduit par une régression des opacités du cristallin.

Les produits pseudodipeptides selon l'invention peuvent s'opposer aux phénomènes oxydatifs responsables de l'athérosclérose. Dans cette pathologie, l'oxydation de particules lipoprotéiques de faible densité (LDL) circulant dans le sang est responsable de la fragmentation de la partie protéique (apoprotéine B) comme de la fraction lipidique de ces particules. Les fragments formés induiraient l'apparition de formes cellulaires anormales (monocytes et macrophages chargés en cholestérol) capables de s'agréger sur les parois des vaisseaux sanguins et de former la plaque d'athérome.

Les produits pseudodipeptides selon l'invention seraient de plus, particulièrement adaptés au traitement de cette maladie dans la mesure où il a été mis récemment en évidence que des phénomènes de glycation sont également impliqués dans la genèse de la plaque d'athérome (Ref. T.J. Lyons - "Glycation and oxidation - A role in the pathogenesis of Atherosclerosis" - American Journal of Cardiology, vol.71, N° 6 (1993), p. 1326-1331).

Les produits pseudodipeptides selon l'invention peuvent également s'opposer au processus de cancérogenèse dans la mesure où il a été démontré que les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène sont responsables de la coupure ou de la modification des brins d'ADN, ces transformations pouvant être à l'origine de l'évolution des cellules saines en cellules cancéreuses.

De même, les propriétés antioxydantes des produits pseudodipeptides selon l'invention permettent d'indiquer ces produits pour le traitement des états inflammatoires pathologiques, et en particulier pour le traitement de l'arthrite rhumatisante. En effet, la détérioration du liquide synovial est un symptôme caractéristique de l'arthrite de type inflammatoire et on a pu montrer que la dégradation d'un de ses constituants essentiels, l'acide hyaluronique, était dû à un "stress oxydatif". Des études plus récentes (Ref. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge - "Chronic inflammation and the auto immune deseases" - Free

Radicals in Biology and Medecine - B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge Eds - Clarendon Press (1989), Oxford, p. 422-438) ont également mis en cause des phénomènes de peroxydation lipidique mis en jeu dans ce processus et qui expliqueraient 5 l'action bénéfique des produits selon l'invention.

Les propriétés antioxydantes des produits pseudodipeptides selon l'invention peuvent également être exploitées en traitement annexe d'une radiothérapie. Cet effet radioprotecteur, déjà connu pour la  $\beta$ -alanyl-histidine 10 repose également sur les propriétés cytostimulantes de ce type de composé, notamment vis-à-vis des cellules de la moelle osseuse, très sensibles aux rayonnements utilisés en radiothérapie.

Selon des données récentes, certains symptômes 15 épileptiques pourraient provenir de lésions provoquées par les radicaux libres oxygénés sur certaines régions du cerveau (Ref. G.R. Jackson, K. Werrbach-Perer, J.R. Perez-Polo - "Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury - II - A conditioning lesion paradigm" - Journal of Neuroscience Research, vol.25, N°3 20 (1990), p.369-374). Le pouvoir régénérant des tissus (nerveux en l'occurrence) des produits de l'invention est un élément important dans cette pathologie associée à une dégénérescence du tissu nerveux. Ces produits pourraient 25 également être indiqués pour le traitement de la maladie de Parkinson dans laquelle serait impliqué un "stress oxydatif" touchant le tissu cérébral.

Certaines affections vasculaires et notamment 30 l'endotoxémie, sont associées à la surproduction d'une espèce radicalaire: le radical nitrite oxyde NO<sup>•</sup>. L'action de ce radical, produit par les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses des vaisseaux sanguins, se traduit par une vasodilatation chronique. Cet état peut notamment être très préjudiciable lors de traitements 35 impliquant des agents vasoconstricteurs. Dans les cellules, une enzyme, la NO-synthase, catalyse la transformation d'un acide aminé, la L-arginine, en NO<sup>•</sup>. Un pseudodipeptide

antioxydant selon l'invention incorporant le radical L-arginyl (ou un dérivé N<sup>o</sup>-méthyl-L-arginyl) dans sa structure, serait capable d'agir directement sur NO<sup>•</sup>, mais également sur l'enzyme responsable de sa synthèse, par un comportement 5 d'inhibiteur de la catalyse enzymatique.

Au niveau de la peau, les propriétés antioxydantes des produits pseudodipeptides de l'invention peuvent être exploitées pour neutraliser les effets des espèces radicalaires oxygénées générées par le rayonnement lumineux. 10 Ils s'opposeront ainsi efficacement aux réactions photo-allergiques (les espèces radicalaires induisent au niveau de la peau la formation de molécules allergisantes). En association avec un principe actif sensible à l'oxydation (ex: Chlorpromazine), ils préviendront sa transformation en 15 un composé毒ique.

Ce principe trouve sa meilleure application lors des traitements par photochimiothérapie de certaines maladies de la peau. En effet ces traitements reposent sur l'utilisation d'un photosensibilisant (ex: psoralène) qui, sous l'effet 20 d'un rayonnement, exerce une action bénéfique (interaction avec l'ADN), mais qui, malheureusement, s'accompagne de la formation d'espèces radicalaires, responsables d'effets secondaires indésirables.

Les produits de l'invention peuvent également être 25 indiqués pour s'opposer à l'apparition de symptômes cutanés chez des individus souffrant de porphyrie, car les porphyrines potentialisent les dommages occasionnés par les R.L.

Ils pourront également s'opposer à la formation de 30 lésions cutanées liée au "stress oxydatif" chez les personnes souffrant de maladies auto-immunes tel que le Lupus Erythémateux Chronique (SLE).

Ils s'opposeront également efficacement aux effets du "coup de soleil": érythèmes, oedèmes et formation de 35 cellules caractéristiques au niveau de la peau.

Les propriétés antioxydantes des composés selon l'invention peuvent bien sûr être utilisées pour la prévention du

vieillissement cutané. En effet, de multiples arguments expérimentaux, analytiques et épidémiologiques, militent en faveur de la théorie selon laquelle l'accumulation des dommages biochimiques provoqués par les R.L. constituerait 5 le processus essentiel du vieillissement. Il est notamment clair que l'exposition au rayonnement solaire, responsable de la formation d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, est une cause du vieillissement cutané prématué.

10 Enfin, il a été démontré expérimentalement que ces composés s'opposaient à d'autres phénomènes caractéristiques du tissu cutané vieillissant :

- La réticulation non-enzymatique de protéines telles que le collagène ou l'élastine par les sucres (V.M. Monnier - "Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the 15 aging process" - Journal of Gerontology, vol. 45, N°4 (1990), p. B105-111),

- La formation de complexes lipoprotéiques: lipofushines (réticulation par des sous-produits du stress oxydatif)

20 Il a été démontré que la L-arginine était capable de s'opposer à la réticulation non-enzymatique (cet amino acide peut se condenser sur les sucres mais aussi sur certains sous-produits dicarbonylés du stress oxydatif). Un pseudodipeptide selon l'invention incorporant dans sa 25 structure un radical L-arginyle sera donc particulièrement indiqué pour s'opposer à ces mécanismes du vieillissement tissulaire.

Une autre série d'applications relève des propriétés cytostimulantes des produits pseudodipeptides selon 30 l'invention et, comme il l'a été démontré, de leurs propriétés immunostimulatrices. Ces propriétés permettent de favoriser la régénération tissulaire et la cicatrisation, et d'une manière générale, de réguler les fonctions faisant intervenir les effecteurs de la réponse immunitaire.

35 Ils peuvent ainsi être utilisés pour favoriser la régénération des tissus conjonctifs cutanés perturbés. Ils

favorisent la réparation des muqueuses après brûlures ou après traitements chimio et radiothérapeutiques.

Selon ce principe, ces produits peuvent également être indiqués pour la prévention et le traitement des rides.

5 Les propriétés cytostimulatrices et régénératrices des peptoïdes s'exercent tout particulièrement vis à vis des tissus musculaires où l'on rencontre des concentrations élevées d'un dipeptide naturel apparenté, la 8-alanyl-histidine. Bien que le rôle physiologique de ce composé  
10 n'est pas, à l'heure actuelle, parfaitement établi, il est étroitement lié au métabolisme musculaire. Ainsi, les produits de l'invention pourraient participer à l'amélioration de la contractilité des muscles, réguler la contraction cardiaque. On peut également utiliser ce type de  
15 propriétés pour le traitement de certaines dégénérescences musculaires telles que la myodystrophie de Dushen.

Les propriétés cicatrisantes des produits pseudodipeptides selon l'invention trouvent leur application dans de nombreux domaines. On peut citer le traitement des  
20 ulcères gastriques, pour lequel un produit dipeptide apparenté à la carnosine, a donné de bons résultats (M. Ito, T. Tanaka and Y. Suzuki - "Effect of N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc (Z-103) on healing and hydrocortisone-induced release of acetic acid ulcers in rats with limited  
25 food-intake-time" - Japanese Journal of Pharmacology, vol.54 (1990), p.513-521). En outre, les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des produits de l'invention sont utiles pour le traitement de cette pathologie. Un chélate de zinc selon l'invention, tel qu'il  
30 a été décrit précédemment, est particulièrement indiqué pour cette application.

Les propriétés cicatrisantes des produits pseudodipeptides selon l'invention sont également particulièrement indiquées pour le traitement des atteintes cornéennes. Ils pourront être administrés en traitement postopératoire, après incision de la cornée pour la correction de la myopie, par exemple.

Ils peuvent également être avantageusement utilisés pour le traitement des pathologies de "l'oeil sec" en favorisant la cicatrisation de l'épithélium cornéen mais également grâce à un comportement de "larme artificielle":  
5 protection des tissus lésés contre le "stress oxydatif" (état, inflammation, rayonnement U.V.), incorporation dans des formulations favorisant la restauration du film lacrymal.

Des compositions contenant les produits  
10 pseudodipeptides de l'invention pourront aussi, de par leur action immunostimulante et régénératrice des tissus, s'opposer aux phénomènes de dégénérescence rétinienne. Ils verront leurs effets renforcés par le fait qu'une composante "stress oxydatif" intervient dans cette pathologie (Ref.  
15 R.E. Anderson, L.M. Rapp, R.D. Wiegand - Current Eye Research, vol.3 (1984), p.223-227).

Les propriétés immunostimulatrices des produits pseudodipeptides de l'invention peuvent enfin être mises à profit pour la potentialisation des vaccins en remplacement  
20 des adjuvants classiquement utilisés pour renforcer la réponse immune chez l'homme (sels d'aluminium, extraits d'origine bactérienne, monophosphoryl A...) dont les effets secondaires ne sont pas négligeables (RK Gupta, EH Relyveld, EB Lindblad, B Bizzini, S Ben-Efraim and CK Gupta  
25 "Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvancity" Vaccine, vol.11, n°3 (1993), P.293-306).

Comme il a déjà été mentionné, certains des pseudodipeptides répondant à la formule générale donnée plus haut, peuvent se comporter comme des inhibiteurs de  
30 l'histamine. Parmi les applications thérapeutiques exploitant cette propriété, on peut citer :

- Un antagoniste de l'histamine pourra s'opposer à l'agrégation plaquettaire avec des applications pour le traitement des affections du système vasculaire  
35 périphérique. En effet, il a été prouvé que l'histamine est un médiateur intracellulaire favorisant l'agrégation plaquettaire (S.P. Saxena, L.J. Brandes, A.B. BeckerK.J.

Simons, F.S. La Bella and J.M. Gerrard, Science, vol. 243, n°24 (1989), P. 1596-1599). L'histamine est également un médiateur intracellulaire impliqué dans la croissance et la multiplication cellulaire (JR. Chanda, A.K. Ganguly Cancer Letters, vol.34 (1987), P. 207). Un pseudodipeptide antagoniste selon l'invention pourra donc être utilisé pour réguler la multiplication cellulaire, notamment au niveau des tissus cicatriciels hypertrophiques (chéloïdes).

- L'histamine est aussi un messager extra-cellulaire intervenant dans de nombreux processus biologiques. Ainsi un antagoniste selon l'invention pourra être appliqué pour le traitement des allergies, de l'inflammation, de certains dysfonctionnements cardiaques,... et pour toutes les pathologies où la libération excessive d'histamine est mise en cause.

Il pourrait ainsi être particulièrement bénéfique d'inclure les produits pseudodipeptides selon l'invention dans les parfums et déodorants afin de s'opposer aux réactions allergiques, et en particulier aux chocs anaphylactiques, provoqués par certaines compositions fortement odorantes.

Certains éléments de cette famille de composés peuvent, à l'inverse du cas précédent, posséder certaines des propriétés de l'histamine (comportement "pro-histaminique").

Un comportement d'antagoniste des récepteurs H<sub>2</sub> de l'histamine permet d'inhiber l'activation des neutrophiles et par conséquent la production excessive de radicaux libres par ces cellules (R. Burde, R Seifert, A.Buschaeur, G. Schultz, "Histamine inhibits activation of human neutrophils and HL-60 leukemic cells via H<sub>2</sub>-receptors" Naunyn-Schmiedebergs Arch. of Pharmacology , vol.340, n°6 (1989), P 671-678) . Ceci permet d'envisager l'utilisation de tel pseudodipeptides pour le traitement de certains états inflammatoires pathologiques.

L'histamine favorise également la multiplication et la croissance cellulaire (G. Kahlson, E. Rosengren, C. Steinhardt Journal of Physiology, vol. 151 (1960), P. 131).

Un composé "pro-histaminique" pourrait ainsi favoriser la régénération cellulaire.

Une série d'applications repose sur la capacité de certains des produits pseudodipeptides selon l'invention possédant dans leur structure un radical L-prolyle ( et dérivés) à s'opposer à une synthèse anormale de collagène et à son accumulation dans les tissus. Cette propriété particulière pourrait être liée à une analogie structurelle avec un dipeptide naturel, la L-glycyl-L-proline favorisant la dégradation du collagène, mais aussi à leurs propriétés antioxydantes car le stress oxydatif a récemment été mis en cause dans la surproduction de collagène (J.C. Geesin, L.J. Hendricks, P.A. Falkenstein, J.S. Gordon, R.A. Berg "Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid: characterization of the role of ascorbate-stimulated lipid peroxidation" Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 290, n°1 (1991) P. 127-132).

L'accumulation de collagène dans les tissus cardiaques est notamment une des complications majeures du diabète.

Ce type de composés est indiqué pour réduire les chéloïdes associés à une surproduction de collagène lors du processus de cicatrisation. Dans la mesure où les pseudodipeptides selon l'invention peuvent également se comporter comme des anti-histaminiques et qu'il a récemment été démontré que l'histamine stimule la production de collagène (A. Hatamochi, H. Ueki, C. Mauch, T. Krieg "Effect of histamine on collagen and collagen mRNA production in human skin fibroblast", Journal of Dermatologic Sciences, Vol 2 (1991), P. 407-412), les peptoides selon l'invention sont particulièrement adaptés à cette application.

#### Applications comme stabilisant et conservateur

L'excellente tolérance vis-à-vis des pseudodipeptides selon l'invention, et leurs propriétés antioxydantes et cytostimulantes modérées permettent de proposer ces produits pour la conservation et la protection

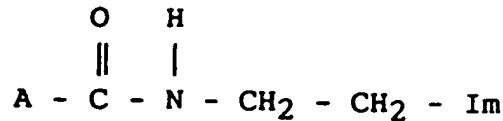
de substances sensibles à l'oxydation, de matières alimentaires ou d'organes et de tissus conservés ex vivo.

On peut citer la prévention de l'oxydation des liposomes afin d'améliorer leur stabilité et d'éviter la 5 formation de sous-produits toxiques, la protection de l'acide hyaluronique incorporé dans des formules cosmétiques contre l'action dépolymérisante des radicaux libres, la protection des huiles et des produits alimentaires oxydables, de produits diététiques.

10 Les produits de l'invention permettent d'améliorer la conservation des vaccins du sang et du serum, la préservation d'organes voués à la transplantation (avec une référence particulière pour le cœur).

## REVENDICATIONS

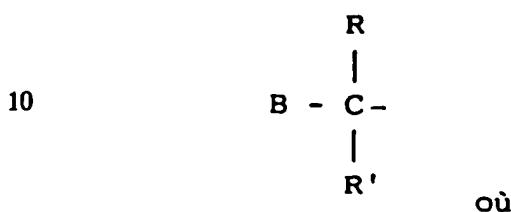
## 1. Produit pseudodipeptide de formule générale



5

dans laquelle A est :

a) soit de la forme



-> B représente une amine dont l'atome d'azote est directement lié à l'atome de carbone et est choisi dans le 15 groupe consistant en

- 1) amines primaires,
- 2) amines secondaires de formule  $-\text{NH-X}$  dans laquelle X est un radical hydrocarboné, fluoroalkyle, acyle, acyloxy, ou une amine,
- 3) amines tertiaires cycliques du type cycloalkyle ou lactame,
- 4) amines tertiaires de formule  $-\text{N-Y}$  dans laquelle Y'

Y' est un radical hydrocarboné, acyle, ou acyloxy,  
25 5) imines de formule  $-\text{N}=\text{C-Y}$  dans laquelle Y est un radical hydrocarboné et Y' est un atome d'hydrogène ou un radical hydrocarboné, et

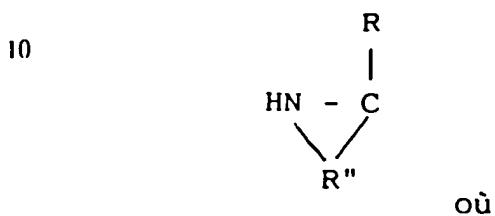
30 6) ammonium de formule  $-\text{N}^+-\text{Y}, \quad \text{W}^-$  dans

laquelle Y, Y', Y" est l'atome d'hydrogène ou un radical hydrocarboné, et l'ion W est un ion halogénure, sulfate, phosphate, bicarbonate, un groupement para-toluène-

sulfonate, ou un composé porteur d'un groupement carboxylate,

-> R ou R' est un atome d'hydrogène, de fluor, ou un radical fluoro-alkyle, ou acyle, ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, ou un groupement fonctionnel lui-même, et

- > Im est un noyau imidazole ou imidazole N-substitué;
- b) soit de la forme



15 R est un atome d'hydrogène, de fluor, ou un radical fluoro-alkyle, acyle ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels, et

R'' est un radical acyle ou un radical hydrocarboné pouvant être substitué par un ou plusieurs groupements fonctionnels,

20 2. Produit pseudodipeptide selon la revendication 1 dans lequel l'atome de carbone de A dans la formule générale est un carbone asymétrique possédant une configuration absolue différente du carbone alpha d'un alpha aminoacide naturel lié par une liaison peptidique à l'histamine.

25 3. Produit pseudodipeptide selon la revendication 1 ou 2 dans lequel les radicaux R et R' ne sont pas des atomes d'hydrogène.

30 4. Produit pseudodipeptide selon la revendication 3 dans lequel au moins un des radicaux R et R' est un atome de fluor.

5. Produit pseudodipeptide selon l'une des revendications 1 à 3 dans lequel au moins un des radicaux R et R' est un radical  $\text{CF}_3$ .

35 6. Produit pseudodipeptide selon la revendication 1 ou 2 dont la formule générale est de la forme a) avec B étant l'aziridine, la pyrrolidine, ou la pipéridine ou un lactame notamment  $\delta$ - ou  $\gamma$ -lactame.

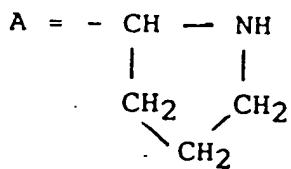
7. Produit pseudodipeptide selon la revendication 1 ou 2 dont la formule générale est de la forme a) avec B étant un ammonium dont l'ion W est un composé porteur d'un groupement choisi dans le groupe consistant en acétate, trifluoroacétate, citrate, gluconate, picrate, aspartate, et glutamate, un ion halogénure, sulfate, phosphate, bicarbonate, et un groupement para-toluène-sulfonate.

8. Produit pseudodipeptide selon l'une des revendications 1 à 7 dans lequel R, R' ou R" est un radical hydrocarboné substitué par un groupement fonctionnel pris dans le groupe consistant en alcool, amine, carboxyle, alkoxy, thioéther, thiol, phosphate et sulfate.

9. Produit pseudodipeptide selon l'une des revendications 1 à 7 dans lequel les radicaux R et R' sont choisis parmi les radicaux isopropyle, isobutyle, sec-butyle, tert-butyle, et néopentyle.

10. Produit pseudodipeptide selon la revendication 1 ou 2 formant un chélate avec un atome de métal consistant en zinc, cuivre, fer, cobalt, manganèse ou nickel

20 11. Produit pseudodipeptide selon la revendication 1 ou  
2 dont la formule générale est de la forme b) avec R" étant  
le radical CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, soit A étant



le produit pseudodipeptide étant la L-prolyl-histamine

12. Produit pseudodipeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'atome d'oxygène du groupement carbonyle de la liaison amide, résultant du couplage entre l'histamine et l'alpha amino acide, est remplacé par un atome de soufre.

13. Procédé chimique de préparation du produit selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé par les étapes suivantes:

- on rend un alpha aminoacide N-protégé par un groupement x,

- on rend ledit alpha aminoacide O-activé par un groupement Y,

5 - on couple ledit alpha aminoacide N-protégé et O-activé avec de l'histamine ou de l'histamine méthyl-substituée, et

- on élimine X ou non selon le produit pseudodipeptide recherché

10 14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'alpha aminoacide est rendu O-activé par estérification de la fonction carboxylique dudit aminoacide.

15 15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'étape d'estérification pour rendre l'alpha aminoacide O-activé est réalisée par la réaction avec un composé choisi dans le groupe consistant en: alcool de cyanométhyle, o-nitrophénol, 2,4,5-trichlorophénol, p-nitrophénol, 2,4-dinitrophénol, pentachlorophénol, pentafluorophénol, N-hydroxyptalimide, N-hydroxysuccinimide, 1-hydroxypipéridine et 5-chloro-8-hydroxy-quinoline.

20 16. Procédé enzymatique de préparation du produit selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il consiste à coupler un alpha aminoacide avec de l'histamine ou de l'histamine méthyl-substituée en présence d'un catalyseur enzymatique du type hydrolase.

25 17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que ledit catalyseur enzymatique est une hydrolase choisie dans le groupe consistant en lipases extraites de micro-organismes ou d'origine animale, et en protéases.

30 18. Application du produit selon l'une des revendications de 1 à 12 pour obtenir un médicament destiné à soigner la cataracte.

19. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament destiné à soigner l'athérosclérose.

35 20. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament destiné à soigner les états inflammatoires.

21. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament destiné à soigner les maladies de la peau associées au stress oxydatif telles que la photoallergie, la porphyrie, et le Lupus Erythémateux.
22. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament contre l'endotoxémie et autres maladies vasculaires associées à une surproduction du radical libre NO<sup>•</sup>
- 10 23. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament destiné à la cicatrisation des tissus tels que les tissus cutanés, la muqueuse gastrique et les tissus oculaires.
- 15 24. Application du produit selon la revendication 10 pour obtenir un médicament pour le traitement des lésions gastriques dans lequel ledit produit pseudodipeptide est sous forme de chélate avec un atome de zinc.
- 20 25. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament agissant comme agent radioprotecteur.
26. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament utilisé comme inhibiteur de la synthèse du collagène.
27. Médicament résultant de l'application selon la revendication 26 pour le traitement de certaines complications du diabète, et pour la réduction des chéloïdes lors du processus de cicatrisation de la peau.
- 30 28. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir une composition thérapeutique ou cosmétique destinée à la régénération et au rajeunissement des tissus tels que les muqueuses et les tissus cutanés.
- 35 29. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament agissant comme immunostimulant pour la potentialisation des vaccins.

30. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament capable de s'opposer à l'agrégation plaquettaire

5 31. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour obtenir un médicament anti-allergique

10 32. Application du produit selon l'une des revendications 1 à 12 pour la conservation et la stabilisation de substances sensibles à l'oxydation, de matières alimentaires ou d'organes et de tissus conservés ex vivo.

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche2711990  
N° d'enregistrement  
nationalFA 497885  
FR 9313480

## DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée
X	JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY. vol. 56, no. 19 , 1991 , EASTON US pages 5606 - 5610 J. F. MODDER ET AL 'Synthesis and X-ray structure of the chiral, polydentate cation binder N-(N-((5-methyl-2thienyl)met hylidene)-L-methionyl)histamine' * page 5607 *	1
X	EP-A-0 372 818 (TANABE SEIYAKU CO) * page 4, ligne 45 - ligne 55 * ---	1
X	EP-A-0 144 290 (CIBA-GEIGY) * page 113, ligne 1 - ligne 12 * ---	1
X	EP-A-0 143 746 (CIBA-GEIGY) * page 117, ligne 1 - ligne 6 * ---	1
X	ZEITSCHRIFT FÜR CHEMIE vol. 9, no. 4 , 1969 page 144 H. AROLD ET AL 'Synthese einige Aminoacylhistamine und -tryptamine' * page 144 *	1
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 90, no. 15, 9 Avril 1979, Columbus, Ohio, US; abstract no. 115121, M. L. PECK ET AL 'Radioprotective potential and chelating properties of glycyldhistamine, an analog of histamine terminal peptides found in bee venom' page 52 ; * abrégé * & TOXICON vol. 16, no. 6 , 1978 pages 690 - 694 -----	1,25

DOMAINES TECHNIQUES  
RECHERCHES (Int.Cl.5)C07D  
C12P  
A61K

2

Date d'achèvement de la recherche

8 Juillet 1994

Examinateur

Voyiazoglou, D

## CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

- X : particulièrement pertinent à lui seul  
 Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  
 A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  
 O : divulgarion non écrite  
 P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention

E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.

D : cité dans la demande

L : cité pour d'autres raisons

A : membre de la même famille, document correspondant